

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

**Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.**

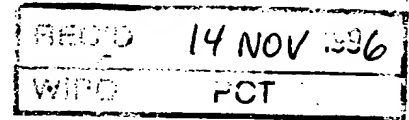
Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

09/068,751



Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Herr Dr. Wolfgang-M. F r a n z in Groß Grönau/Deutsch-
land hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Vektor-System zur spezifischen in vivo
Genexpression in Herzmuskelzellen"

am 1. Oktober 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wie-
dergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmel-
dung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die
Symbole C 12 N und A 61 K der Internationalen Patentklas-
sifikation erhalten.

München, den 24. April 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

HofB

Aktenzeichen: 196 40 630.7

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4503-31102



501

Vektor-System zur spezifischen in vivo Genexpression in Herzmuskelzellen

Anmelder: Dr. Wolfgang-M. Franz

Erfinder: Dr. Wolfgang-M. Franz, Thomas Rothmann, Prof. Dr. Hugo A. Katus

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Vektor-System, welches in vivo eine spezifische Genexpression in Herzmuskelzellen ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Vektor-System ist Bestandteil eines viralen oder nicht-viralen Genshuttles, in dem ein beliebiges Gen bzw. ein beliebiger funktioneller DNA-Abschnitt gekoppelt an die regulatorische DNA-Sequenz der kardialen Myosin Leichtkette (MLC)-2 einkloniert ist.

Anwendungsbeispiele sind die Medizin, die Gentechnik und die pharmazeutische Industrie.

Dieses Vektorsystem verfügt über die Eigenschaft zur spezifischen Genexpression im Herzmuskelgewebe bevorzugt im Ventrikel in vivo, so daß ein beliebiges Gen, gekoppelt an die regulatorische DNA-Sequenz von Myosin Leichtkette (MLC)-2, mit unterschiedlicher Zielsetzung spezifisch exprimiert werden kann.

Patentansprüche

1. Vektor-System zur spezifischen in vivo Genexpression in Herzmuskelzellen, bevorzugt im Ventrikel, dadurch gekennzeichnet, daß es Bestandteil eines viralen oder nicht-viralen Genshuttles ist, in dem ein beliebiges Gen bzw. ein beliebiger funktioneller DNA-Abschnitt gekoppelt an die regulatorische DNA-Sequenz von MLC-2 einkloniert ist.
2. Vektor-System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das beliebige Gen bzw. der beliebige funktionelle DNA-Abschnitt eine Intron- und ^{ol} Poly A-Sequenz enthält.
3. Vektor-System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es Teile oder Varianten der regulatorischen MLC-2 Sequenz der Ratte oder einer anderen Spezies, bevorzugt des Menschen oder eines Säugetieres, eingesetzt werden.
4. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein virales Genshuttle-System eingesetzt wird.
5. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein replikationsdefizientes adenovirales Genshuttlesystem eingesetzt wird.
6. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Adeno-assoziiertes Genshuttle-System eingesetzt wird.

01.10.96

7. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
ein nicht-virales Genshuttlesystem eingesetzt wird.

8. Vektor-System nach Anspruch 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
ein Genshuttle auf der Basis einer Lipofektion eingesetzt wird.

9. Verwendung des Vektor-Systems nach Anspruch 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
es als Bestandteil eines viralen bzw. nicht-viralen Genshuttles die gezielte Expression einer
therapeutischen DNA steuert, welche bei einer zu behandelnden Krankheit qualitativ oder
quantitativ verändert werden soll.

10. Verwendung des Vektor-Systems nach Anspruch 1 bis 3 zur Gentherapie, wobei das
Vektor-System konfektioniert und über die Blutbahn, vorzugsweise über ein modifiziertes
thetervfahren in das arterielle oder venöse Koronarsystem appliziert wird.

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49 4569 71002

S02

Beschreibung

Herzmuskel-spezifische Genexpression durch replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren

Abstrakt

Rekombinante Adenoviren sind vielversprechende „Shuttle“-Vektoren für eine zukünftige Gentherapie von Herzmuskelerkrankungen. Ihre Fähigkeit verschiedene Zelltypen zu infizieren, kann jedoch zur Expression von vermeintlich therapeutischen Genen außerhalb des Herzmuskels und damit zu unerwünschten Risiken führen. Um die Genexpression auf Kardiomyozyten zu beschränken, wurde ein rekombinantes Adenovirus (Ad-mlcLuc) konstruiert, in dem der Herzmuskel-spezifische „myosin light chain“-2v (mlc-2v Promotor der Ratte die Transkription eines Luciferase-Reportergens reguliert. Als Kontrollen wurden die entsprechenden adenoviralen Konstrukte ohne Promotor (Ad-Luc) und mit dem „Rous Sarkoma Virus“ (RSV) (rsv Promotor (Ad-rsvLuc) erstellt. Unsere Daten zeigen, daß der neue virale Vektor Ad-mlcLuc *in vitro* spezifisch in primären Rattenkardiomyozyten, nicht jedoch in drei etablierten Zelllinien (HeLa, H9c2 und A10) aktiv war. Durch die Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer von neonatalen Ratten wurde die Herzmuskel-spezifische Genexpression von Ad-mlcLuc *in vivo* bewiesen, obwohl unterschiedliche Mengen adenoviraler DNA durch PCR-Analysen in allen untersuchten Geweben der infizierten Tiere nachweisbar waren. *In vitro* und *in vivo* war der mlc-2v Promotor spezifisch in Herzmuskelzellen aktiv, und erreichte dort 8-9 % der Luciferaseaktivität des rsv-Promotors. Die direkte Injektion von Ad-mlcLuc in den Oberschenkelmuskel neonataler Ratten ergab nur eine Hintergrundaktivität für Luciferase von etwa 0.05 % im Vergleich zu Ad-rsvLuc. Im adenoviralen „Shuttle“-Vektor-System ermöglicht der mlc-2v Promotor die Herzmuskel-spezifische Genexpression eines Fremdgens und ist daher ein nützliches Vehikel für einen gerichteten Gentransfer in das Herz.

Schlüsselwörter: Adenovirus, Herzmuskel, Myosin Leichtkette-2v Promotor, Genexpression

Einleitung

Der neu etablierte adenovirale Vektor Ad-mlcLuc ist *in vitro* spezifisch in Herzmuskelzellen neonataler Ratten aktiv. Darüberhinaus führt der „myosin light chain-2v“ (mlc-2v) Promotor *in vivo* zu einer spezifischen Luciferase-Expression im Herzen. In 11 anderen untersuchten Geweben (Interkostalmuskel, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) kam es durch den mlc-2v Promotor zu keiner Luciferase-Expression, obwohl in diesen Geweben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Southernblot adenovirale DNA nachgewiesen werden konnte. Die direkte Injektion von Ad-mlcLuc in den Oberschenkelmuskel neonataler Ratten bestätigte, daß der mlc-2v Promotor nicht im Skelettmuskel, sondern nur im Herzmuskel aktiv ist. Adenovirale Vektoren, bei denen ein Fremdgen unter Kontrolle des mlc-2v Promotors steht, stellen somit ein nützliches Vehikel für einen gerichteten Gentransfer in das Herz dar.

Ergebnisse

Konstruktion der rekombinanten Adenoviren

Zur Bestätigung der Spezifität des mlc-2v Promotors wurden drei verschiedene rekombinante Adenoviren hergestellt (siehe Abbildung 1 a-c). Die Konstruktion der replikationsdefizienten Adenoviren erfolgte durch homologe Rekombination der klonierten Plasmide pAd-mlcLuc, pAd-rsvLuc und pAd-Luc mit dem zuvor isolierten großen ClaI Fragment der del324-

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-7190

S03

Mutante des Adenovirus 5. Nach Kotransfektion in 293-Zellen wurden virale Plaques auf die korrekte Integration des Transgens untersucht und klonal auf 293-Zellen vermehrt. Die rekombinanten Adenoviren tragen das Luciferasereportergen in 3'-Richtung von der Verpackungssequenz in der ehemaligen E1-Region. Im rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc steuert der Herzmuskel-spezifische „myosin-light-chain“-2v (mlc-2v) Promotor, in Ad-rsvLuc der „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotor die Expression des Luciferasegens. Im Adenovirus Ad-Luc wurde das Luciferasegen ohne vorgeschalteten Promotor in das adenovirale Genom integriert und diente so als Negativkontrolle.

Expression des Transgens in den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 sowie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit rekombinanten Adenoviren

Die Luciferaseaktivität wurde in HeLa- (humanes Zervixkarzinom), H9c2- (Ratte, Herzmuskelblast), A10- (Ratte Aorta) Zellen und in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc bestimmt. Infektion erfolgte unter Standardbedingungen mit einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 10. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde im Vergleich zu den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 die höchste Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-Luc gemessen. In Lysaten Ad-rsvLuc (Positivkontrolle) infizierter neonataler Kardiomyozyten wurde insgesamt die höchste Luciferaseaktivität, (in „Relative Light Units“ (RLU) pro μg Protein) gefunden, wobei sich die Ergebnisse für die verschiedenen Zelllinien kaum unterschieden. In HeLa-, H9c2- und A10-Zellen war die Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc vergleichbar mit der der Negativkontrolle Ad-Luc; Dahingegen war sie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte für Ad-mlcLuc um den Faktor 21 höher als die für Ad-Luc und erreichte hier 8 % der durch Ad-rsvLuc induzierten Luciferaseaktivität.

Expression des Transgens nach Injektion von rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer von neonatalen Ratten

Um die Herzmuskel-spezifische Aktivität des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc zu untersuchen, wurden jeweils 20 μl ($= 2 \times 10^9$ „plaque forming units“ (p.f.u.)) der rekombinanten Adenoviren direkt in die Herzkammer neonataler Ratten injiziert. In gleicher Weise wurden auch als Positivkontrolle Ad-rsvLuc und als Negativkontrolle Ad-Luc injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität in 12 verschiedenen Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) bestimmt. Die ermittelte Luciferaseaktivität in RLU/mg Gewebe wird in Abbildung 2 zusammengefaßt. Adenovirus Ad-mlcLuc, der den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor trägt, zeigte eine Luciferaseaktivität, die auf den Herzmuskel beschränkt blieb (Abbildung 2a). Die Injektion der Positivkontrolle Ad-rsvLuc zeigte die höchste Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, im Herzen und eine starke Luciferaseaktivität in Lunge, Thymus und Diaphragma (Abbildung 2b). Im Ad-Luc injizierten Tier wurde eine geringe Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, Herz, Thymus und Diaphragma gemessen (Abbildung 2c). Im Herzen war die Ad-mlcLuc induzierte Luciferaseaktivität 17 mal höher als die von Ad-Luc, während in allen anderen Geweben die Luciferaseaktivität von Ad-Luc und Ad-mlcLuc vergleichbar stark war. Damit wurde gezeigt, daß Ad-mlcLuc spezifisch im Herzen aktiv ist. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-mlcLuc 9 % der RSV-Promotoraktivität im Herzen. Die Verteilung infizierter Herzmuskelzellen nach Injektion von Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten wurde in Vorexperimenten durch die Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-rsv β gal zusätzlich überprüft. Das rekombinante Adenovirus Ad-rsv β gal exprimiert die β -Galaktosidase als Reportergen unter Kontrolle des „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotors. Fünf Tage nach der Injektion erfolgte die Sektion des

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71002

Mutante des Adenovirus 5. Nach Kotransfektion in 293-Zellen wurden virale Plaques auf die korrekte Integration des Transgens untersucht und klonal auf 293-Zellen vermehrt. Die rekombinanten Adenoviren tragen das Luciferasereporterogen in 3'-Richtung von der Verpackungssequenz in der ehemaligen E1-Region. Im rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc steuert der Herzmuskel-spezifische „myosin-light-chain“-2v (mlc-2v) Promotor, in Ad-rsvLuc der „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotor die Expression des Luciferasegens. Im Adenovirus Ad-Luc wurde das Luciferasegen ohne vorgeschalteten Promotor in das adenovirale Genom integriert und diente so als Negativkontrolle.

Expression des Transgens in den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 sowie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit rekombinanten Adenoviren

Die Luciferaseaktivität wurde in HeLa- (humanes Zervixkarzinom), H9c2- (Ratte, Herzmyoblast), A10- (Ratte Aorta) Zellen und in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc bestimmt. Die Infektion erfolgte unter Standardbedingungen mit einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 10. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde im Vergleich zu den etablierten Zelllinien HeLa, H9c2 und A10 die höchste Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-Luc gemessen. In Lysaten Ad-rsvLuc (Positivkontrolle) infizierter neonataler Kardiomyozyten wurde insgesamt die höchste Luciferaseaktivität, (in „Relative Light Units“ (RLU) pro μg Protein) gefunden, wobei sich die Ergebnisse für die verschiedenen Zelllinien kaum unterschieden. In HeLa-, H9c2- und A10-Zellen war die Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc vergleichbar mit der der Negativkontrolle Ad-Luc; Dahingegen war sie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte für Ad-mlcLuc um den Faktor 21 höher als die für Ad-Luc und erreichte hier 8 % der durch Ad-rsvLuc induzierten Luciferaseaktivität.

Expression des Transgens nach Injektion von rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer von neonatalen Ratten

Um die Herzmuskel-spezifische Aktivität des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc zu untersuchen, wurden jeweils 20 μl ($= 2 \times 10^9$ „plaque forming units“ (p.f.u.)) der rekombinanten Adenoviren direkt in die Herzkammer neonataler Ratten injiziert. In gleicher Weise wurden auch als Positivkontrolle Ad-rsvLuc und als Negativkontrolle Ad-Luc injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität in 12 verschiedenen Geweben (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn und Quadriceps femoris) bestimmt. Die ermittelte Luciferaseaktivität in RLU/mg Gewebe wird in Abbildung 2 zusammengefaßt. Adenovirus Ad-mlcLuc, der den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor trägt, zeigte eine Luciferaseaktivität, die auf den Herzmuskel beschränkt blieb (Abbildung 2a). Die Injektion der Positivkontrolle Ad-rsvLuc zeigte die höchste Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, im Herzen und eine starke Luciferaseaktivität in Lunge, Thymus und Diaphragma (Abbildung 2b). Im Ad-Luc injizierten Tier wurde eine geringe Luciferaseaktivität im Interkostalmuskel, Herz, Thymus und Diaphragma gemessen (Abbildung 2c). Im Herzen war die Ad-mlcLuc induzierte Luciferaseaktivität 17 mal höher als die von Ad-Luc, während in allen anderen Geweben die Luciferaseaktivität von Ad-Luc und Ad-mlcLuc vergleichbar stark war. Damit wurde gezeigt, daß Ad-mlcLuc spezifisch im Herzen aktiv ist. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-mlcLuc 9 % der RSV-Promotoraktivität im Herzen.

Die Verteilung infizierter Herzmuskelzellen nach Injektion von Adenoviren in die Herzkammer neonataler Ratten wurde in Vorexperimenten durch die Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-rsv β gal zusätzlich überprüft. Das rekombinante Adenovirus Ad-rsv β gal exprimiert die β -Galaktosidase als Reportergen unter Kontrolle des „Rous Sarcoma Virus“ (rsv) Promotors. Fünf Tage nach der Injektion erfolgte die Sektion des

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

49 4509-71002

S04

Tieres und die Expression der β -Galaktosidase wurde nach Färbung des Transgens bestimmt. In den histologischen Schnitten sind infizierte Zellen durch Blaufärbung des Kerns zu erkennen. Etwa die Hälfte der myokardialen β -Galaktoseaktivität zeigte sich im Bereich der Einstichstelle in die Herzkammer. Entlang des Kanals der Injektionsnadel fand sich in fast allen Kardiomyozyten β -Galaktoseaktivität (Abbildung 3a), wohingegen im restlichen Myokard die Anzahl infizierter Kardiomyozyten gering war (Abbildung 3b).

Expression des Transgens nach Injektion von rekombinanten Adenoviren in die Oberschenkelmuskulatur neonataler Ratten

Um die Aktivität des mlc-2v Promotors im Skelettmuskel zu untersuchen, wurden 20 μ l mit 2×10^9 „plaque forming units“ (p.f.u.) der drei rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc in den rechten Oberschenkelmuskel Quadriceps femoris neonataler Ratten injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Ad-Luc und Ad-mlcLuc zeigten vergleichbar geringe Luciferaseaktivitäten (RLU/mg Gewebe) im injizierten Muskel, während Ad-rsvLuc sehr stark aktiv war (Tabelle 1). Die Luciferaseaktivität, erzielt durch Ad-mlcLuc, betrug 0,05 % von Ad-rsvLuc. Diese Daten zeigen, daß Ad-mlcLuc im Skelettmuskel nicht aktiv ist und bestätigen die Herzmuskel-spezifische Genexpression durch den rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc.

Nachweis adenoviraler DNA in Geweben nach Injektion rekombinanter Adenoviren in die Herzkammer

Um das Ausmaß der Infektion von Nicht-Herzgewebe nach Injektion der rekombinanten Adenoviren in die Herzkammer zu bestimmen, wurde die genomische DNA aus 12 Geweben isoliert (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps femoris) und die Präsenz der adenoviralen DNA in diesen Geweben durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt. Es wurden die Gewebe von jeweils zwei mit Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc infizierten Tieren untersucht. In Vorversuchen wurde die Sensitivität des Nachweises adenoviraler DNA bestimmt, indem 100 ng genomischer DNA von nicht infizierten Ratten mit abnehmenden Mengen adenoviraler DNA Ad del 324 (von 10 pg bis 0,1 fg) vermischt und anschließend mittels PCR untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, daß 10 fg der adenoviralen DNA Ad del 324 in 100 ng genomischer DNA nicht infizierter Tiere noch nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht 0,017 adenoviralen Genomen pro Zelle (Abbildung 4a). In mit Adenovirus infizierten Tieren wurde die virale DNA regelmäßig im Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma und Leber nachgewiesen (Abbildung 4b zeigt drei repräsentative Tiere). Um die Sensitivität des Nachweises der adenoviralen DNA zu steigern, wurden die PCR-Produkte auf eine Nylon-Membran überführt und durch Southernblot Hybridisierung nachgewiesen. Dies zeigte, daß die adenovirale DNA in geringeren Mengen auch in den anderen Geweben nachgewiesen werden kann, mit geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren. In Abbildung 4c wird ein repräsentativer Southernblot für ein Ad-mlcLuc injiziertes Tier gezeigt.

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß die Genexpression des rekombinanten Adenovirus Ad-mlcLuc auf den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor und nicht auf eine lokal erhöhte Viruskonzentration zurückzuführen ist.

Diskussion

Wir beschreiben ein neues adenovirales "Shuttle"-Vektor, Ad-mlcLuc, der erstmals die ausschließliche Expression eines Transgens in Kardiomyozyten erlaubt. Dies wird durch den Herzmuskel-spezifischen mlc-2v Promotor erreicht, der im rekombinanten Adenovirus Ad-

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

0494509-1102

S05

mlcLuc das Transgen exprimiert (18, 30). Die spezifische Genexpression durch Ad-mlcLuc wurde in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im Herzmuskel *in vivo* gezeigt. Mit der Negativkontrolle Ad-Luc wurde nach identischen Injektionsbedingungen die höchste Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten bestimmt; diese war achtmal höher als in H9c2 Zellen, zwanzigmal höher als in HeLa Zellen und siebenmal höher als in A10 Zellen. Diese höhere Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten könnte durch die bessere Infizierbarkeit dieser Zellen durch die Adenoviren erklärt werden.

Die Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-mlcLuc und Ad-rsvLuc in die Herzkammer der neonatalen Ratten zeigte die Herzmuskel-spezifische Genexpression von Ad-mlcLuc *in vivo*. Im Herzmuskel Ad-mlcLuc infizierter Tiere wurde eine 17-fach höhere Luciferaseaktivität bestimmt als für die Negativkontrolle Ad-Luc. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-mlcLuc 9 % der Luciferaseaktivität im Herzmuskel. Damit sind die relativen Luciferaseaktivitäten der Viren in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im neonatalen Herzen *in vivo* sehr gut vergleichbar. In den 11 weiteren untersuchten Geweben (Interkostalmuskel, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps femoris) lag die Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-mlcLuc nicht über der nach Injektion der promotorlosen Kontrolle Ad-Luc. Anzumerken ist, daß in Herz, Diaphragma und Interkostalmuskel nach Injektion von Ad-Luc eine geringe Luciferaseaktivität nachweisbar war. Diese Basisaktivität könnte möglicherweise auf einer kryptischen Promotoraktivität viraler DNA-Sequenzen beruhen.

Im Gegensatz zu Ad-mlcLuc konnte nach Injektion von Ad-rsvLuc in Interkostalmuskel, Thymus, Lunge und Diaphragma eine hohe Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Die Luciferaseexpression in diesen Geweben wurde auch nach intrakavitärer Injektion eines adenoviralen Vektors beobachtet, bei dem der Cytomegalievirus (CMV)-Promotor die Luciferaseexpression antreibt (16).

Um ein zusätzliches Kriterium für die Spezifität der Luciferaseexpression zu bekommen, wurde die Präsenz der adenoviralen DNA in den verschiedenen Geweben durch PCR bestimmt. Die adenovirale DNA wurde nach intrakavitärer Injektion der Viren im Interkostalmuskel, Herzen, Thymus, in der Lunge, im Diaphragma und in der Leber nachgewiesen. Mit Ausnahme der Leber sind dies dieselben Gewebe, in denen auch die Luciferaseexpression nach Injektion von Ad-rsvLuc nachgewiesen wurde. Die Abwesenheit der Luciferaseaktivität in der Leber, trotz des Nachweises adenoviraler DNA in diesem Gewebe, könnte an der geringeren RSV-Promotoraktivität in der Leber liegen. Im transgenen Mausmodell wurde gezeigt, daß der RSV-Promotor in der Leber weitgehend inaktiv ist (20). Damit korreliert die durch PCR nachweisbare adenovirale DNA sehr gut mit der Luciferaseaktivität in Ad-rsvLuc injizierten Tieren. Im Gegensatz zu Ad-rsvLuc blieb im Ad-mlcLuc injizierten Tier die Luciferaseaktivität auf das Herz beschränkt, obwohl die adenovirale DNA deutlich in anderen Geweben nachgewiesen wurde. Folglich kann durch das rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc eine Herzmuskel-spezifische Genexpression gewährleistet werden. Die Herzmuskel-spezifische Expression von Ad-mlcLuc wurde durch die Ergebnisse der Injektion der rekombinanten Viren in den Oberschenkelmuskel der neonatalen Ratten bestätigt. Während Ad-mlcLuc und Ad-Luc vergleichbar niedrige Luciferaseaktivitäten zeigten, nach dem

Adenovirus AdShK beispielsweise eine starke Expression des Drosophila Shaker Kaliumkanals in der Leber. Wie die Autoren mitteilten, könnte dies phänotypisch insofern erhebliche Konsequenzen haben, als das Membranpotential der Hepatozyten für die zelluläre Aufnahme von Gallensäuren verantwortlich ist (37). Durch den Einsatz des neuen adenoviralen Vektors Ad-mlcLuc, der eine Herzmuskel-spezifische Genexpression ermöglicht, könnten derartige Nebenwirkungen auf nicht-kardiale Zielzellen vermieden werden.

...werden.

Da der rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc ein Vektor erster Generation ist, ist die Genexpression zeitlich auf einige Wochen begrenzt. Dies könnte in manchen Fällen vorteilhaft sein, in anderen Fällen wäre jedoch möglicherweise eine länger anhaltende Expression wünschenswert. Die derzeit noch begrenzte Dauer der Expression des Transgens könnte künftig durch die Herstellung adenoviraler Vektoren der zweiten und dritten Generation überwunden werden. Eine Kombination aus dem gewebespezifischen mlc-2v Promotors und adenoviralen Vektoren der zweiten und dritten Generation könnte zu rekombinanten Adenoviren führen, die eine lang anhaltende und Herzmuskel-spezifische Genexpression erlauben und sich so zur Therapie von Herzmuskelerkrankungen, wie der dilativen oder hypertrophen Kardiomyopathie eignen.

Material und Methoden

Konstruktion der rekombinanten Plasmide pAd-Luc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc

Die Plasmide pAd-Luc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc sind Derivate des Plasmids pAd.RSV- β gal, in dem die BamHI-KpnI RSV- β gal („Rous Sarcoma Virus“-Promotor und β -Galaktosidase Reportergen)-Kassette gegen die Luciferase cDNA mit ihrem endogenen Polyadenylierungssignal ausgetauscht ist (15). Hierfür wurde das HindIII/KpnI Fragment des Plasmids pSVOAL 5', welches für das Luciferasegen kodiert, in die HindIII/KpnI Klonierungsschnittstellen des Vektors pBluescriptSK (Stratagene) subkloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-Luc erzeugt (27). Das BamHI/KpnI Luciferase Fragment des Subklons pBluescript-Luc wurde anschließend in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd.RSV- β gal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-Luc erzeugt. Für die Klonierung des Plasmids pAd-rsvLuc wurde das BamHI/HindIII RSV-Fragment (587 bp) des Plasmids pAd.RSV- β gal in die BamHI/HindIII Schnittstellen des Subklons pBluescript-Luc kloniert und dadurch das Plasmid pBluescript-rsvLuc erzeugt. Anschließend wurde das BamHI/KpnI RSV-Luciferase-Fragment des Plasmids pBluescript-rsvLuc in die BamHI/KpnI Schnittstellen von pAd.RSV- β gal kloniert und dadurch das Plasmid pAd-rsvLuc erzeugt. Für die Herstellung des Plasmids pAd-mlcLuc wurde das BamHI/KpnI mlc-Luciferase-Fragment (ca. 0.8 kb „myosin light chain“-2v-Promotor und 1.8 kb Luciferasegen) aus Plasmid pMLCL 5' direkt in die BamHI/KpnI Schnittstellen des Plasmids pAd-RSV β gal kloniert (30).

Konstruktion der rekombinanten Adenoviren

Die rekombinanten Adenoviren wurden durch homologe Rekombination zwischen den Plasmiden pAd-Luc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc und der genomischen DNA von Adenovirus del324 (Ad5) in 293-Zellen erzeugt (15, 26). Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^6 293-Zellen in eine kleine Zellkulturschale ausplattiert. Fünf μ g des großen ClaI-Fragments der genomischen DNA von Ad5 wurden zusammen mit 5 μ g der AatII linearisierten Plasmide pAdLuc, pAd-rsvLuc und pAd-mlcLuc nach der Kalziumphosphatmethode in 293-Zellen kotransfiziert. Nach Überschichten mit Weichagar (1 % SeaPlaque Agarose, 1x MEM, 2 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0.1 μ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) und 8-10 Tagen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂, wurden virale Plaques

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4505-73002

SG5

mlcLuc das Transgen exprimiert (18, 30). Die spezifische Genexpression durch Ad-mlcLuc wurde in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im Herzmuskel *in vivo* gezeigt.

Mit der Negativkontrolle Ad-Luc wurde nach identischen Injektionsbedingungen die höchste Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten bestimmt; diese war achtmal höher als in H9c2 Zellen, zwanzigmal höher als in HeLa Zellen und siebenmal höher als in A10 Zellen. Diese höhere Luciferaseaktivität in neonatalen Kardiomyozyten könnte durch die bessere Infizierbarkeit dieser Zellen durch die Adenoviren erklärt werden.

Die Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-mlcLuc und Ad-rsvLuc in die Herzkammer der neonatalen Ratten zeigte die Herzmuskel-spezifische Genexpression von Ad-mlcLuc *in vivo*. Im Herzmuskel Ad-mlcLuc infizierter Tiere wurde eine 17-fach höhere Luciferaseaktivität bestimmt als für die Negativkontrolle Ad-Luc. Im Vergleich zu Ad-rsvLuc erreichte Ad-mlcLuc 9 % der Luciferaseaktivität im Herzmuskel. Damit sind die relativen Luciferaseaktivitäten der Viren in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* und im neonatalen Herzen *in vivo* sehr gut vergleichbar. In den 11 weiteren untersuchten Geweben (Interkostalmuskel, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Niere, Gehirn, Quadriceps femoris) lag die Luciferaseaktivität nach Injektion von Ad-mlcLuc nicht über der nach Injektion der promotorlosen Kontrolle Ad-Luc. Anzumerken ist, daß in Herz, Diaphragma und Interkostalmuskel nach Injektion von Ad-Luc eine geringe Luciferaseaktivität nachweisbar war. Diese Basisaktivität könnte möglicherweise auf einer kryptischen Promotoraktivität viraler DNA-Sequenzen beruhen.

Im Gegensatz zu Ad-mlcLuc konnte nach Injektion von Ad-rsvLuc in Interkostalmuskel, Thymus, Lunge und Diaphragma eine hohe Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Die Luciferaseexpression in diesen Geweben wurde auch nach intrakavitärer Injektion eines adenoviralen Vektors beobachtet, bei dem der Cytomegalievirus (CMV)-Promotor die Luciferaseexpression antreibt (16).

Um ein zusätzliches Kriterium für die Spezifität der Luciferaseexpression zu bekommen, wurde die Präsenz der adenoviralen DNA in den verschiedenen Geweben durch PCR bestimmt. Die adenovirale DNA wurde nach intrakavitärer Injektion der Viren im Interkostalmuskel, Herzen, Thymus, in der Lunge, im Diaphragma und in der Leber nachgewiesen. Mit Ausnahme der Leber sind dies dieselben Gewebe, in denen auch die Luciferaseexpression nach Injektion von Ad-rsvLuc nachgewiesen wurde. Die Abwesenheit der Luciferaseaktivität in der Leber, trotz des Nachweises adenoviraler DNA in diesem Gewebe, könnte an der geringeren RSV-Promotoraktivität in der Leber liegen. Im transgenen Mausmodell wurde gezeigt, daß der RSV-Promotor in der Leber weitgehend inaktiv ist (20). Damit korreliert die durch PCR nachweisbare adenovirale DNA sehr gut mit der Luciferaseaktivität in Ad-rsvLuc injizierten Tieren. Im Gegensatz zu Ad-rsvLuc blieb im Ad-mlcLuc injizierten Tier die Luciferaseaktivität auf das Herz beschränkt, obwohl die adenovirale DNA deutlich in anderen Geweben nachgewiesen wurde. Folglich kann durch das rekombinante Adenovirus Ad-mlcLuc eine Herzmuskel-spezifische Genexpression gewährleistet werden. Die Herzmuskel-spezifische Expression von Ad-mlcLuc wurde durch die Ergebnisse der Injektion der rekombinanten Viren in den Oberschenkelmuskel der neonatalen Ratten bestätigt. Während Ad-mlcLuc und Ad-Luc vergleichbar niedrige Luciferaseaktivitäten zeigten, nachdem sie direkt in den Oberschenkel der neonatalen Ratte injiziert wurden, war Ad-rsvLuc sehr stark aktiv. Ad-Luc und Ad-mlcLuc erreichten im injizierten Skelettmuskel lediglich 0,05 % der Luciferaseaktivität von Ad-rsvLuc.

Die Fähigkeit, die rekombinante Genexpression so zu programmieren, daß sie auf das Myokard beschränkt bleibt, könnte für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen nützlich sein. So könnte beispielsweise bei Patienten mit X-chromosomaler Kardiomyopathie auf der Basis eines defekten Dystrophinproteins die Expression des Dystrophingens im Herzmuskel zu einer signifikanten Verbesserung der Kardiomyopathie führen (3). In früheren Versuchen mit adenoviralen Vektoren konnte keine auf Kardiomyozyten beschränkte Genexpression gewährleistet werden (4, 16, 17). Nach Applikation der Adenoviren wurde die Expression des Transgens in verschiedenen Nicht-Kardiomyozyten beobachtet. Nebenwirkungen aufgrund einer unerwünschten Expression des Transgens in Nicht-Zielzellen führen zu begründeten Sicherheitsbedenken. So verursachte die intrakardiale Injektion des rekombinanten

01.10.95

ausgestanzt und auf 293-Zellen klonal vermehrt. Aus 2×10^6 vollständig infizierten 293-Zellen wurde die virale DNA der rekombinanten Viren isoliert und durch hydraulischen Verdau mit Restriktionsendonukleasen auf die korrekte Integration des Transgens untersucht. Von den positiven viralen Klonen wurde ein erneut eine Einzelplaquereinigung durchgeführt bevor sie in 293-Zellen für eine Großaufarbeitung vermehrt und durch zweimalige Caesium-Chlorid-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt wurden (15). Schließlich wurden die Viren gegen TD-Puffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM CaCl_2 , 1 mM Mg Cl_2 , 10 % (v/v) Glycerol, 25 mM Tris-HCl pH 7.4) dialysiert und bei -72°C eingefroren. Zur Bestimmung der Titer der präparierten Adenoviren wurde der „Plaque Assay“ unter Verwendung von 293-Zellen durchgeführt (15). Alle rekombinanten Adenoviren hatten einen Titer von etwa 10^{11} „plaque forming units“ (p.f.u.)/ml. Die DNA der viralen Stammlösungen wurde isoliert und mittels Restriktionsenzymanalyse und PCR auf die korrekte Integration des Inserts untersucht. Ferner wurden die viralen Stammlösungen mittels PCR auf den Wildtyp Ad-5 untersucht, wobei in 50 ng der adenoviralen DNA keine Kontamination nachweisbar war (38).

Infektion von Zellen in Gewebekultur (*in vitro*)

Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten wurden wie von Sen et al. 1988 beschrieben präpariert und kultiviert. A10-, H9c2- und HeLa-Zellen wurden in „Dulbecco's modified eagle's medium“ (DMEM), 293-Zellen in MEM komplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 0.1 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Einen Tag vor der Infektion wurden 2×10^5 frisch präparierte neonatale Kardiomyozyten oder 1×10^5 Zellen der etablierten Zelllinien H9c2, A10 und HeLa in Triplika auf „12 well“ Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden in 0.2 ml des jeweiligen serumfreien Mediums, das die rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mcLuc in einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 10 enthielt inkubiert (10 Viren/Zelle). Nach 1 h Inkubation bei 37°C mit leichtem Schwanken alle 15 min wurden 2 ml des jeweiligen komplettierten Mediums zugegeben. Alle Infektionsexperimente wurden 4 bis 5 mal wiederholt.

Luciferase-Bestimmung

Für die *in vitro* Studien wurden die Zellen 48 h nach der Infektion geerntet. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität in Proteinextrakten nach etablierten Protokollen mittels Transiluminometer Lumat LB 9501 (Bertold, Wildbad) bestimmt (40). Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach Bradford (1976) bestimmt (BioRad, München). Die Luciferaseaktivität wurde in pg Luciferase pro µg Protein umgerechnet wie beschrieben (10, 18). Für die *in vivo* Studien wurden die Ratten 5 Tage nach Injektion dekapitiert. Zwölf verschiedene Gewebe (Interkostalmuskel, Herz, Thymus, Lunge, Diaphragma, Bauchmuskel, Leber, Magen, Milz, Nieren, Quadriceps femoris, Gehirn) wurden entnommen und sofort im flüssigen N_2 eingefroren. Anschließend wurden die Gewebeprobe gewogen, in 200 µl Lysepuffer (1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 100 mM Kaliumphosphat pH 7.8) aufgenommen, in einem Glasomogenisator aufgeschlossen und für 15 min bei 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Luciferase-Bestimmung eingesetzt (31, 40). Die Luciferaseaktivität wurde in „relative light units“ (RLU)/mg Gewebenaßgewicht angegeben, nach Abzug der Hintergrundaktivität, die für die verschiedenen Gewebe in nicht-infizierten Tieren ermittelt wurde.

In vivo Injektionen in die Herzkammer und den Oberschenkelmuskel

Alle Injektionen wurden an spezifisch pathogenfreien 2-3 Tage alten Sprague Dawley Ratten (CRWiga, Sulzfeld) durchgeführt. Vor den Injektionen wurden die neonatalen Ratten durch 3-5 min Inhalation mit Methoxyfluran (Metofane, Jann=ssen GmbH) narkotisiert. 2×10^9 „plaque forming units“ (p.f.u.) der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mlcLuc wurden in einem Volumen von 20 μ l mittels einer Tuberkulinspritze (27,5 gauge) injiziert. Die Injektion erfolgte durch direkte Punktion der Herzkammer durch den Brustkorb lateral im 4. Interkostalraum. Durch Aspiration von Herzblut wurde sichergestellt, daß die Nadelspitze intrakavitär positioniert war. Eine langsame Injektion der Viren (20 μ l/min) wurde durch einen selbstkonstruierten Aufsatz für Tuberkulinspritzen erreicht. Die Injektion der rekombinanten Adenoviren in Quadriceps femoris wurde entsprechend durchgeführt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Parallel zu den Luciferase-Bestimmungen wurde genomische DNA aus den Sedimenten der Gewebehomogenate der mit Adenoviren infizierten neonatalen Ratten unter Verwendung des QIAamp Tissue Kit (Fa. Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert. Jeweils zwei der mit Ad-Luc, Ad-rsv-Luc und Ad-mlcLuc infizierten Tiere wurden auf die Gewebeverteilung der injizierten Viren durch die PCR zum Nachweis der adenoviralen DNA untersucht wie von Zhang et al. 1995 beschrieben, mit geringen Abweichungen (38). Einhundert ng genomische DNA wurde als Probe zusammen mit 40 ng der Oligonukleotide 2B-1 und E2B-2 und 1.25 U Taq Polymerase von Promega in einem Reaktionsvolumen von 5 μ l eingesetzt (38). Gelelektrophorese des spezifischen PCR Produktes ergab eine 860 bp Bande.

Die Sensitivität der PCR wurde in Vorversuchen bestimmt. Hier wurden 100 ng genomische DNA einer nicht infizierten Ratte mit abnehmenden Mengen Ad-del324 DNA gemischt und in einer Polymerasekettenreaktion als Probe eingesetzt. Um die Sensitivität des Nachweises der PCR zu erhöhen, wurden die PCR Produkte auf eine GeneScreenPlus Nylonmembran (NEN, Boston, Massachusetts) durch Kapillarblot transferiert und anschließend durch Southernblot-Hybridisierung nachgewiesen (40). Als Sonde wurde das durch PCR amplifizierte adenovirale 860 bp DNA-Fragment der Positivkontrolle eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel gereinigt und durch „random hexanucleotide prime“ mit 32 P radioaktiv markiert und als Probe für die Hybridisierung verwendet (40). Die Sensitivität des PCR-Nachweises konnte auf diese Weise um den Faktor 10 bis 100 verbessert werden.

β -Galaktosidase-Bestimmung

Die Herzen neonataler Ratten wurden in N_2 gekühltem Isopentan eingefroren und bei -70°C gelagert. Das Herzgewebe wurde in O.C.T. (Tissue Tek, Miles, USA) Einfriermedium eingebettet und 10 μ m Gewebeschnitte mit einem Kryostat (Frigocut 2800 E, Leica) gefertigt. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in Lösung A fixiert (PBS, 0.2 % (v/v) Glutaraldehyd, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl_2), 3 x 10 min mit Lösung B gewaschen (PBS, 0.01 % (v/v) Na-Desoxycholat, 0.02 % (v/v) Nonidet P40, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl_2) und über Nacht bei 37°C in Lösung C gefärbt (Lösung B + 1 mg/ml X-Gal, 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$). Anschließend wurde einmal mit Lösung B und einmal mit destilliertem Wasser für 10 min gewaschen. Eine schwache Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin, sowie das Dehydrieren und Einbetten der Proben erfolgte nach Standardprotokollen (41).

01.10.98

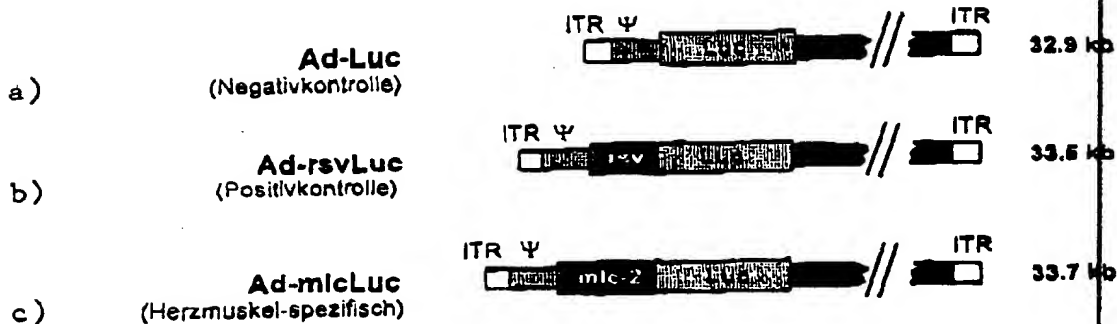


Abbildung 1: Replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren wurden durch homologe Rekombination in 293-Zellen erzeugt. Die erhaltenen Viren stammen vom Adenovirus del324 ab, wobei das Luciferasegen in die ehemalige E1-Region kloniert wurde. Die Expression des Luciferasegens wird entweder durch keinen Promotor (Ad-Luc/Negativkontrolle) (a), den rsv Promotor (Ad-rsvLuc/Positivkontrolle) (b), oder den mlc-2v Promotor (Ad-mlcLuc/Herzmuskel-spezifisch) kontrolliert. (ITR = „Inverted Terminal Repeats“, Ψ = Verpackungssequenz, rsv = „Rous Sarkoma Virus“, mlc-2 = „myosin light chain“-2v Promotor).

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71902

S06

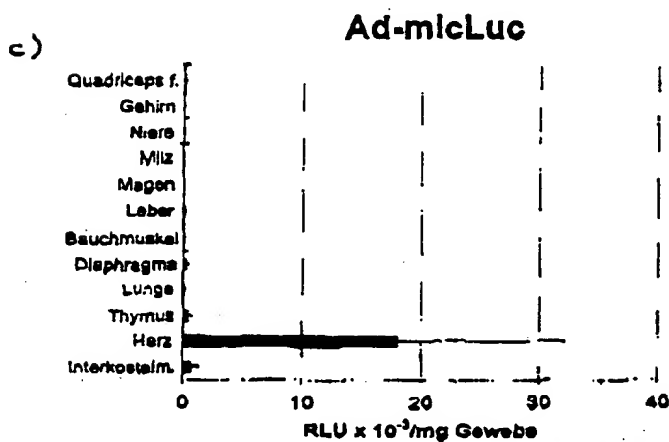
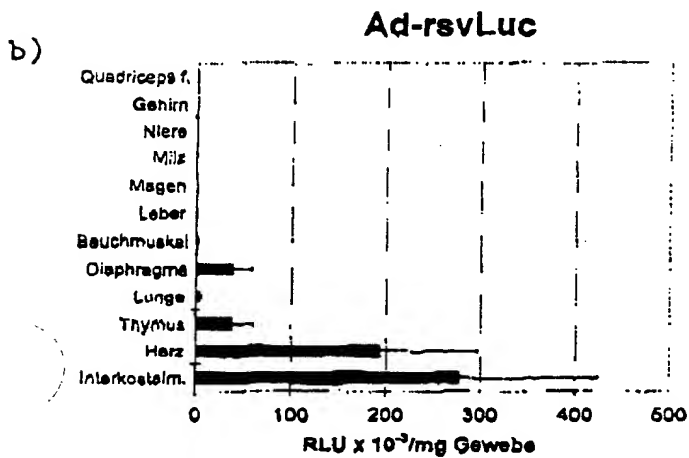
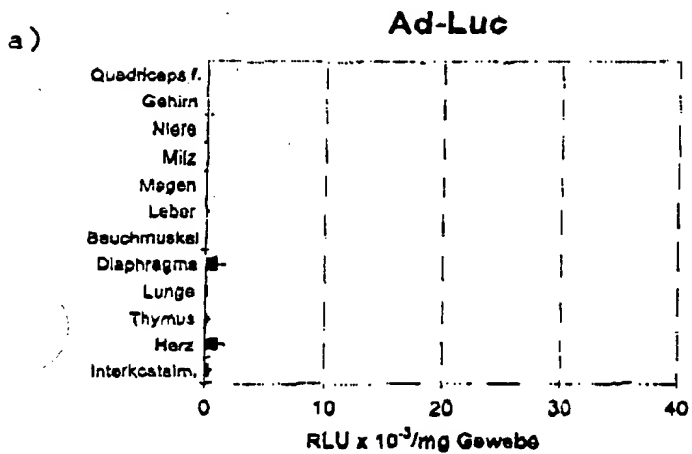


Abbildung 2: Luciferaseaktivität in 12 verschiedenen Geweben nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc. 2×10^5 p.f.u. in einem Volumen von 20 μ l wurden in die Herzkammer neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. Die Luciferaseaktivität wird angegeben in „Relativ Light Unit“ (RLU)/mg Gewebe (Naßgewicht). Die Säulen zeigen den Mittelwert aus vier Experimenten an, der mittlere Balken gibt die Standardabweichung des Mittelwertes an. Maßstab von Ad-rsvLuc beachten.

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71000

S07

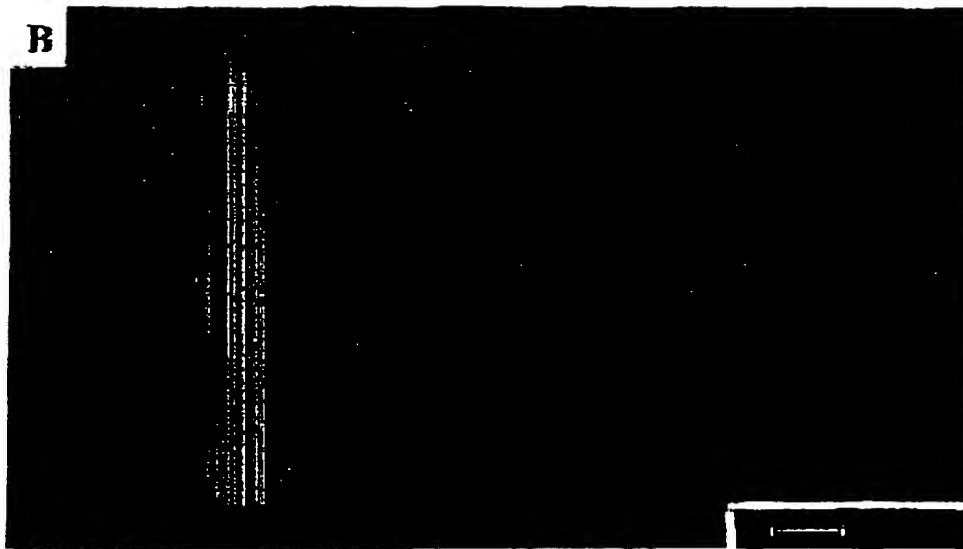


Abbildung 3 : Histologischer Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität im Myokard 5 Tage nach intrakavitärer Injektion des Adenovirus Ad.RSV β gal. (A) Fotografie eines histologischen Schnittes durch den Apex (Injektionsstelle). (B) Fotografie eines histologischen Schnittes durch den linken Ventrikel. Blaufärbung repräsentiert β -Galaktosidaseaktivität. Der Balken entspricht 100 μ m.

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

01-10-96 21:59

S08

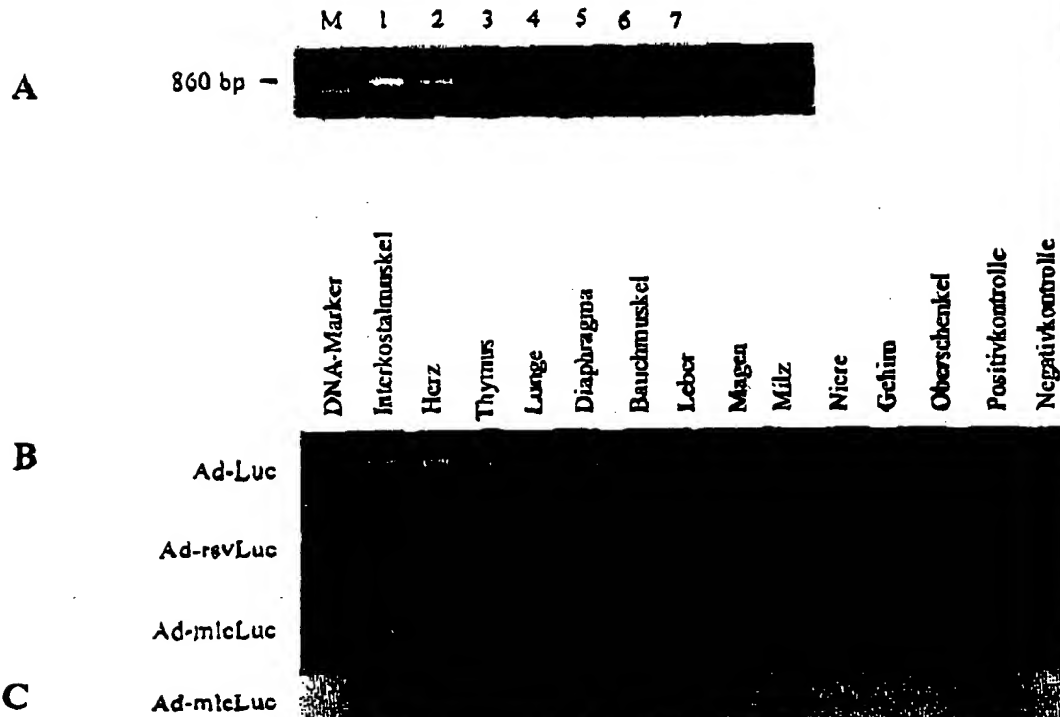


Abbildung 4 : Nachweis der adenoviralen DNA in 12 verschiedenen Geweben nach Intrakavitärer Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc. (A) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das spezifische 860 bp PCR Produkt, das durch Amplifikation von abnehmenden Mengen Adde1324 DNA erzeugt wurde. Als Probe wurden 100 ng genomische DNA der Ratte gemischt mit Adde1324 DNA eingesetzt: 10 pg (Spur 1); 1 pg (Spur 2), 100 fg (Spur 3); 10 fg (Spur 4); 1 fg (Spur 5); 0.1 fg (Spur 6); keine virale DNA (Spur 7). M-DNA-Marker (100 bp Leiter). (B) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das 860 bp PCR-Produkt, amplifiziert aus 100 ng genomischer DNA, welche aus den angegebenen Geweben nach Intrakavitärer Injektion von Ad-Luc (oben), Ad-rsvLuc (mitte) und Ad-

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71002

S09

01.10.98

2

	Ad-Luc	Ad-rsvLuc	Ad-mloLuc
RLU $\times 10^3$ /mg Quadriceps f.	3,4 \pm 1,2	5670 \pm 3239	2,8 \pm 1,8

Tabelle 1: Luciferaseaktivität im Quadriceps f. fünf Tage nach Injektion von 2×10^9 p.f.u. (20 μ l) der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-mloLuc in den Oberschenkel neonataler Ratten. Angegeben werden die Mittelwerte für vier Versuchstiere \pm Standardabweichung.

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4503-71002

S08

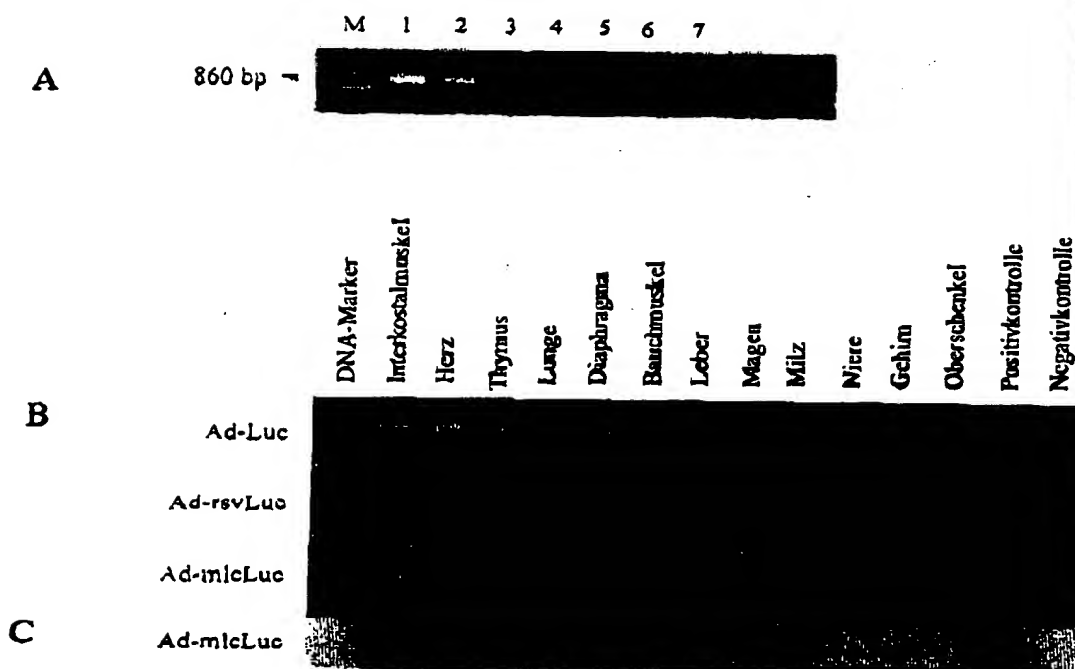


Abbildung 4 : Nachweis der adenoviralen DNA in 12 verschiedenen Geweben nach intrakavitärer Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc und Ad-micLuc. (A) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das spezifische 860 bp PCR Produkt, das durch Amplifikation von abnehmenden Mengen Adde1324 DNA erzeugt wurde. Als Probe wurden 100 ng genomische DNA der Ratte gemischt mit Adde1324 DNA eingesetzt: 10 pg (Spur 1); 1 pg (Spur 2), 100 fg (Spur 3); 10 fg (Spur 4); 1 fg (Spur 5); 0.1 fg (Spur 6); keine virale DNA (Spur 7). M-DNA-Marker (100 bp Leiter). (B) Das Agarosegel (2.4%) zeigt das 860 bp PCR-Produkt, amplifiziert aus 100 ng genomischer DNA, welche aus den angegebenen Geweben nach intrakavitärer Injektion von Ad-Luc (oben), Ad-rsvLuc (mitte) und Ad-micLuc (unten) isoliert worden war. Ein PCR Ansatz mit 100 ng genomischer DNA der Ratte gemischt mit 1 pg Adde1324 DNA diente als Positivkontrolle, ein Ansatz ohne Adde1324 DNA als Negativkontrolle. (C) Southern Blot-Analyse des Ad-micLuc infizierten Tieres in (B). Als Sonde wurde das 32 P-markierte 860 bp PCR Produkt aus einem Kontrollansatz verwendet.

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4503-73002

S10

References

1. In: Congenital heart disease in adults. In: Braunwald E (ed). *Congenital heart disease*. Saunders: Philadelphia, 1992, pp 1810-1826.
2. Towbin JA et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993; 87: 1854-1865.
3. Franz WM et al. X-linked dilated cardiomyopathy: novel mutation of the dystrophin gene. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 752: 470-491.
4. Kass-Eisler A et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11498-11502.
5. Guzman RJ et al. Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res* 1992; 73: 1202-1207.
6. Barr E et al. Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication defective adenovirus. *Gene Therapy* 1994; 1: 51-58.
7. Kirshenbaum LA et al. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1993; 92: 381-387.
8. Chunock RM et al. Immunization by selective infection with type 4 adenovirus in human diploid tissue cultures. I. Safety and lack of oncogenicity and tests for potency in volunteers. *J Am Med Assoc* 1966; 195: 445-452.
9. Yang Y et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4407-4411.
10. Krougliak V, Graham FL. Development of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1575-1586.
11. Wang Q, Jia XC, Finer, MH. A packaging cell line for propagation of recombinant adenovirus containing two lethal gene-region deletions. *Gene Therapy* 1995; 2: 775-783.
12. Yeh P et al. Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J Virol* 1996; 70: 339-345.
13. Engelhardt JP, Ye X, Dorans B, Wilson JM. Ablation of E2a in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6196-6200.
14. Yang Y et al. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; 7: 362-369.
15. Stradford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 1992; 90: 626-630.
16. Huard J et al. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Therapy* 1995; 2: 107-115.
17. Kass-Eisler A et al. The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus mediated gene transfer. *Gene Therapy* 1994; 1: 395-402.
18. Franz WM et al. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res* 1993; 73: 629-638.
19. Lee KJ et al. Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene. *J Biol Chem* 1992; 267: 15875-15885.
20. Lee JL, Hickey R, Zhu H, Chien KR. Positive regulatory elements (HF-1a and HF-1b) and a novel negative regulatory element (HF-3) mediate ventricular muscle-specific expression of myosin light-chain 2-luciferase fusion genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1220-1229.
21. Zou Y, Chien KR. EF1A/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2972-2982.
22. Yu Y-T et al. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 1992; 6: 1783-1798.
23. Zhu H et al. A novel, tissue-restricted zinc finger protein (HF-1b) binds to the cardiac regulatory element (HF-1b/MEF-2) within the rat myosin light chain-2 gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4432-4444.
24. Zhu H et al. A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2273-2281.
25. Overbeek PA, Lai SP, Van Quill KR, Westphal M. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal repeats. *Science* 1986; 231: 1574-1577.
26. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74.
27. Wei JR et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 723-737.
28. Hearing P, Sherk T. The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 1983; 33: 695-703.
29. Hearing P, Samulski RJ, Wishart WL, Sherk T. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* 1987; 61: 2555-2558.
30. Henderson SA et al. Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene. *J Biol Chem* 1989; 264: 1842-1848.
31. Acasadi G et al. A differential efficiency of adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Gen* 1994; 3: 579-584.
32. Ragot T et al. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human

01-10-96 21:59

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71002

S11

Myocardial gene delivery by adenoviral shuttle vector
T Rothmann et al

8

- minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 1993; 361: 647-650.
- 33 Vincent N et al. Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat Genet* 1993; 3: 130-134.
- 34 Quandt B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, Mandel JL. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2581-2584.
- 35 Bessereau JL et al. In vivo and in vitro analysis of electrical activity-dependent expression of muscle acetylcholine receptor genes using adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1304-1308.
- 36 Jin Y et al. Effect of enhancer sequences on ventricular myosin light chain-2 promoter activity in heart muscle and nonmuscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 210: 260-266.
- 37 Johns DC et al. Adenovirus-mediated expression of a voltage-gated potassium channel in vitro (rat cardiac myocytes) and in vivo (rat liver). *J Clin Invest* 1993; 96: 1152-1158.
- 38 Zhang WW, Koch PE, Roth JA. Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *BioTechniques* 1995; 18: 444-447.
- 39 Sen A et al. Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 large T antigen. *J Biol Chem* 1988; 263: 19132-19136.
- 40 Ausbel FM et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene and Wiley: New York, 1989.
- 41 Gossler A, Zachgo J. Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. In: Joyner AL (ed). *Gene Targeting*. Oxford University Press, 1993, pp 181-225.

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71002

S05

01.10.96

~~Stellungnahme~~

Weitere Erläuterung zur Erfindung

~~zu 4) Es wurde angemerkt, dass das mlc-2/Luciferase Fusionskonstrukt ungenügend~~
 beschrieben wurde. Die Klonierung des mlc-2/Luciferase Fusionskonstrukt wurde wie
 folgt durchgeführt: Das Plasmid pAd-mlcLuc ist ein Derivat des Plasmids pAd-
 RSV β gal (Stratford Perricaudet, 1992). Um Plasmid pAd-mlcLuc zu erzeugen, wurde
 das *Bam*HI/*Kpn*I mlc-Luciferase-Fragment (ca. 0.8 kb „myosin light chain“-2v-
 Promotor und 1.8 kb Luciferasegen) aus Plasmid pMLCL Δ 5' (Henderson, 1989) direkt
 in die *Bam*HI/*Kpn*I Schnittstellen des Plasmids pAd-RSV β gal kloniert. In Abbildung 1
 wird das Plasmid schematisch dargestellt.

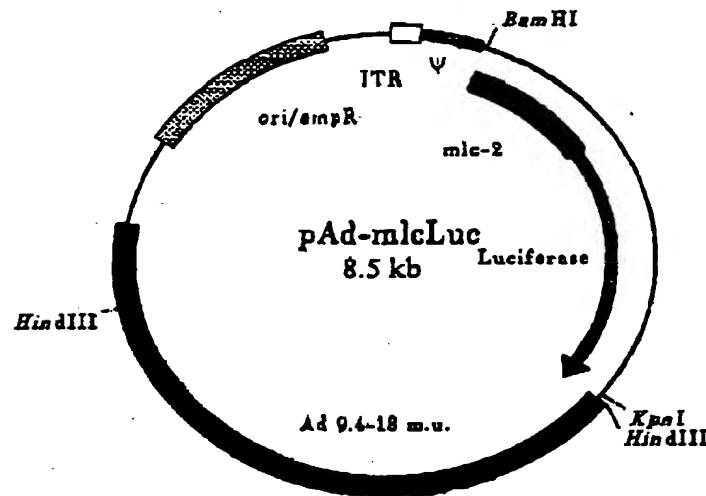


Abbildung 1: Schematische Darstellung des konstruierten Plasmids pAd-mlcLuc (8.5 kb). Die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI, *Kpn*I und *Hind*III sind eingezeichnet (ITR = „Inverted Terminal Repeats“; ψ = Verpackungssequenz; mlc-2 = „myosin light chain“-2v-Promotor; Ad 9.4-18 m.u. = adenovirale Sequenz von 9.4 bis 18 map units von Adenovirus Typ 5; ori/ampR = „origin of replication“ / Ampicillin-Resistenzgen).

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4309-11002

S06

zu 7) 1. Es wurde richtig angemerkt, daß aus den Literaturstellen D1-D3 die herzmuskelspezifische Genexpression des mhc-2-Promotors hervorgeht. Die herzmuskelspezifische Genexpression wurde jedoch nur in transienten Transfektionsexperimenten mit Plasmidvektoren und für transgene Tiere gezeigt und nicht für adenovirale Vektoren. ^{Wie sich die Gewebespezifität aus} Das ~~ein zelltypspezifischer Promotor seine Gewebespezifität~~ in adenoviralen Vektoren ^{verhält} behält ist prinzipiell nicht voraussagbar. Da der E1A-Enhancer in den rekombinanten Adenoviren noch vorhanden ist (er überlappt mit der Verpackungssequenz ψ und kann daher nicht deletiert werden (Lit.)) kann es zu Interferenzen mit dem eingefügten Promotor-Enhancer kommen. In der Literaturstelle D4 wird unter anderem der herzmuskelspezifische cTNC Promotor genannt um ihn für einen herzmuskelspezifischen Gentransfer einzusetzen. Weder die Gewebespezifität von cTNC noch von einem anderen herzmuskelspezifischen Promotor konnte bisher im adenoviralen Shuttle-Vektor-System nachgewiesen werden. Der von uns untersuchte mhc-2 Promotor ist bisher der einzige Promotor für den eine herzmuskelspezifische Genexpression in einem adenoviralen Vektor gezeigt wurde. Da die Wahl eines gewebespezifischen Promotors für einen gewebespezifischen Gentransfer durch adenovirale Vektoren nicht trivial ist, und nur bei hinreichender Suche gefunden werden kann, soll an zwei Beispielen demonstriert werden.

Beispiel 1: Der glatte Muskulatur spezifische smmhc-Promotor ist inaktiv im adenoviralen Shuttle-Vektor-System.

Kallmeier et al. (1995) konnte zeigen, daß der 1225 bp „smooth muscle myosin heavy chain“-smmhc-Promotor des Kaninchens in glatten Muskelzellen spezifisch aktiv war. Im Vergleich zu einer promotorlosen Negativkontrolle erreichte der 1225 bp smmhc-Promotor eine 18-fach über dem Hintergrund liegende Luciferaseaktivität. Vor kurzem konnte in unserer Gruppe die Spezifität der Genexpression auch in Transgenen Mäusen gezeigt werden. Im adenoviralen Vektorsystem konnten wir für den 1225 bp smmhc-Promotor in glatten Muskelzellen keine spezifische Aktivität nachweisen. In Abbildung 2 werden die Ergebnisse der Infektionen gezeigt. Die Luciferaseaktivität wurde in neonatalen Kardiomyozyten, neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen und adulten glatten Gefäßmuskelzellen nach Infektion mit Ad-Luc, Ad-

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49 7503-71002

507

rsvLuc, Ad-mlcLuc und Ad-smmhcLuc bestimmt. Die Infektion erfolgte unter Standardbedingungen mit einer „multiplicity of infection“ von 10. 48 h nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt. In Lysaten Ad-rsvLuc infizierter neonataler Kardiomyozyten wurde die höchste Luciferaseaktivität (RLU/ μ g Protein) gemessen. Sie betrug 300-900 mal mehr als in Lysaten glatter Gefäßmuskelzellen (Abbildung 1). Die Luciferaseaktivität der promotorlosen Negativkontrolle Ad-Luc war in neonatalen Kardiomyozyten 12-45 mal höher als in adulten und neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen (Abbildung 1). Die Luciferaseaktivität Ad-smmhcLuc infizierter neonataler und adulten glatter Gefäßmuskelzellen war 3-4 mal geringer, als die der promotorlosen Kontrolle Ad-Luc. Damit ist Ad-smmhcLuc in glatten Gefäßmuskelzellen inaktiv. In neonatalen Kardiomyozyten war die Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc 21 mal höher, als die von Ad-Luc und 129 mal höher, als die von Ad-smmhcLuc. Hingegen war in neonatalen und adulten glatten Gefäßmuskelzellen, die durch Ad-mlcLuc induzierte Luciferaseaktivität 3-4 mal geringer, als die von Ad-Luc und 2 mal geringer, als die von Ad-smmhcLuc. Damit ist Ad-mlcLuc spezifisch in neonatalen Kardiomyozyten aktiv und erreicht im Vergleich zu Ad-rsvLuc 8% der in neonatalen Kardiomyozyten induzierten Luciferaseaktivität. Es wurde gezeigt, daß der mlc-2 Promotor in neonatalen Kardiomyozyten aktiv ist, während die erwartete Aktivität des smmhc-Promotors in neonatalen und adulten glatten Muskelzellen ausblieb.

Die erzielten Ergebnisse für den smmhc-Promotor wurden bisher nicht veröffentlicht, hauptsächlich da es sich um „negativ“ Ergebnisse handelte. Es ist anzunehmen, daß bereits mehrere muskelspezifische Promotoren in Adenoviren getestet wurden und wegen fehlenden Nachweises der spezifischen Expression nicht veröffentlicht wurden. So steht die Demonstration der herzmuskelspezifischen Genexpression durch den cTNC Promotor bzw. die glatte Muskulatur spezifische Genexpression durch den Endothelin-Promotor von Leiden ebenfalls noch aus. Es erscheint uns daher nicht trivial einen gewebespezifischen Promotor zu charakterisieren, der für einen muskelspezifischen, im vorliegenden Fall einen herzmuskelspezifischen Gentransfer brauchbar ist. Daher halten wir den Nachweis der herzmuskelspezifischen Genexpression durch den mlc-2-Promotor im adenoviralen Shuttle-Vektor-System für eine erfinderische Tätigkeit.

01.10.96

25-09-96 09:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4509-71002

S05

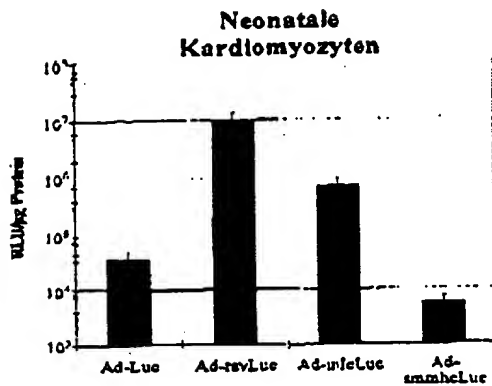
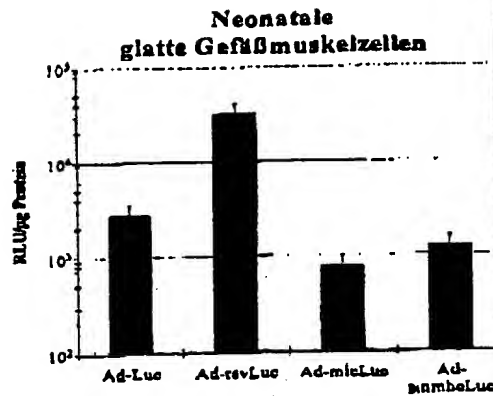
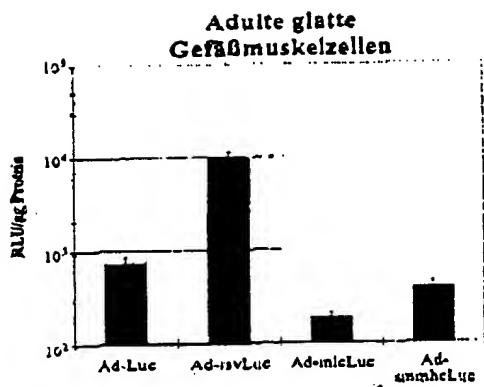


Abbildung 2: Gemessene Luciferaseaktivitäten („Relative Light Units“ (RLU)/ μ g Protein) nach Infektion von adulten glatten Gefäßmuskelzellen, neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen und neonatalen Kardiomyozyten der Ratte mit den rekombinanten Adenoviren Ad-Luc, Ad-rsvLuc, Ad-mhcLuc und Ad-ammhcLuc. Die Luciferaseaktivität wurde 48 h nach der Infektion (m.o.i. 10) bestimmt. Jede Säule steht für den Mittelwert aus vier Experimenten. Der mittlere Balken gibt die Standardabweichung des Mittelwertes an. Beachte den veränderten Maßstab für neonatale Kardiomyozyten.

25-03-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

+49-4999-71002

S09

Beispiel 2: Der α mhc-Promotor ist nur unzureichend herzmuskelspezifisch im adenoviralen Vektorsystem.

In einem zweiten Beispiel soll die herausragende Spezifität des mhc-2 Promotors verdeutlicht werden. Hierfür konstruierten wir einen rekombinanten Adenovirus (Ad-mhcLuc) bei dem der dddd bp α mhc Promotor der Ratte die Expression des Luciferasereportergens kontrollierte. In Abbildung 3 a,b sind die Ergebnisse der Injektion des rekombinanten Adenovirus Ad-mhcLuc und Ad-mhcLuc in die Herzkammer von neonatalen Ratten dargestellt. Nach intrakavitärer Injektion von ca. 2×10^9 plaque forming units (Plauebildende Einheiten) des rekombinanten Adenovirus Ad-mhcLuc (3a) und Ad-mhcLuc (3b) in die linke Hauptkammer konnte für beide Viren die höchste Luciferaseaktivität im Herzen nachgewiesen werden. Festzustellen ist, daß Ad-mhcLuc 3-4 mal aktiver im Herzen war als Ad-mhcLuc. In allen anderen Geweben war die durch Ad-mhcLuc induzierte Luciferaseaktivität höher als die von Ad-mhcLuc. In Abbildung 3c wird das Verhältnis der Luciferaseaktivitäten von Ad-mhcLuc und Ad-mhcLuc dargestellt. Es wird deutlich, daß Ad-mhcLuc in der Niere, Milz, Leber, Diaphragma, Lunge und Interkostalmuskel 2-10 fach aktiver ist als Ad-mhcLuc. Damit ist gezeigt, daß der mhc-2-Promotor im adenoviralen Vektorsystem die Expression der Luciferase wesentlich stärker auf das Herz beschränkt als der α mhc-Promotor. Zusätzlich ist der mhc-2-Promotor im Herzen wesentlich aktiver als der α mhc-Promotor.

Da der mhc-2-Promotor bisher als einziger Promotor im adenoviralen Shuttle-Vektor-System spezifisch ein Fremdgen im Herzen exprimieren kann, wollen wir dies als überraschenden Vorteil gegenüber dem Stand der Technik geltend machen.

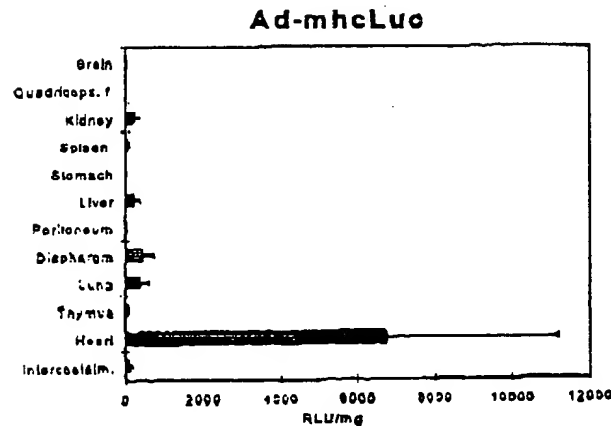
25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

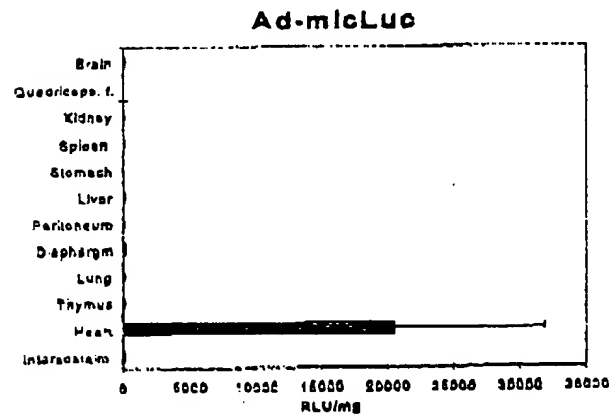
+49-499-71002

S10

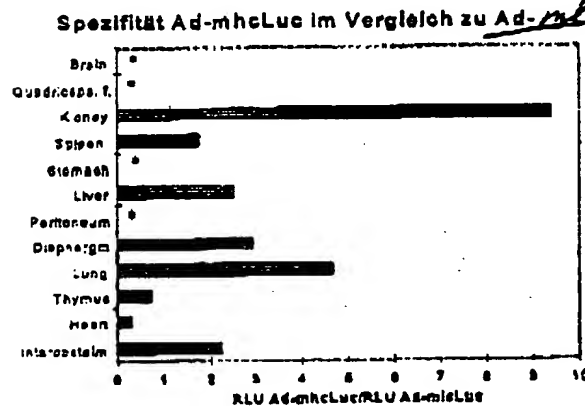
a)



b)



c)



entl. Relation
zu Background
Ad/Luc

Abbildung 3: Dargestellt wird die erzielte Luciferaseaktivität (RLU/mg Gewebe) nach intrakavitärer Injektion von ca. 2×10^9 plaque forming units (Plaquesbildende Einheit) des rekombinanten Aden virus Ad-mhcLuc (a) und Ad-micLuc (b) in die linke Hauptkammer neonataler Ratten. Beide Viren zeigen die höchste Luciferaseaktivität im Herzen. Ad-micLuc ist 3-4 mal aktiver im Herzen als Ad-mhcLuc. In (c) wird die relative Luciferaseaktivität von Ad-mhcLuc in den verschiedenen Geweben zu der Luciferaseaktivität von Ad-micLuc ins Verhältnis gesetzt. Es wird deutlich, daß Ad-mhcLuc in der Niere, Milz, Leber, Diaphragma, Lunge und Intercostal m. 2-10 fach aktiver ist als Ad-micLuc (* = RLU von Ad-mhcLuc ist kleiner als 10 RLU/mg Gewebe und wird daher nicht für die Auswertung berücksichtigt).

25-09-96 00:15

Dr. Wolfgang-M. Franz

01.10.96

49-4519-71002

S11

zu 7) 2. Im Patent von Leiden und Barr (D4) wird die Verwendung eines Herzmuskel-spezifischen Promotors für eine spezifische Genexpression im Herzen vorgeschlagen. Eine Genexpression die im Herzen auf den Ventrikel beschränkt bleibt wurde in D4 nicht genannt. Vor kurzem konnten wir zeigen, daß durch die Verwendung des mlc-2 Promotors eine Ventrikel-spezifische Genexpression nach adenoviralen Gentransfer durch Ad-mlc^{Luc} erzielt werden kann (Abbildung 4). Nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-mlcLuc, Ad-mhcLuc und Ad-Luc wurde ~~die Kontraktionskraft des Ventrikels~~ nur für Ad-mlcLuc eine auf den Ventrikel beschränkte Genexpression bestimmt. Das Verhältnis der Luciferaseaktivität von Ad-mlcLuc im Ventrikel zum Atrium betrug ca. 30, während es für alle anderen Viren 1-2 betrug (s. Abbildung 4). Ein auf den Ventrikel eingeschränkter Gentransfer ist von großem Nutzen. So ist es theoretisch möglich, mit therapeutischen Genen gezielt die Kontraktionskraft des Ventrikels zu steigern. Dies hat aus hämodynamischen Gesichtspunkten eine Reihe von Vorteilen,.... . Damit verfügt das Adenovirus Ad-mlcLuc über eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem in D4 beanspruchten Verfahren. Aus diesem Grund halten wir die Etablierung unseres Vektorsystems für einen erfinderische Tätigkeit

25-09-96 00:15

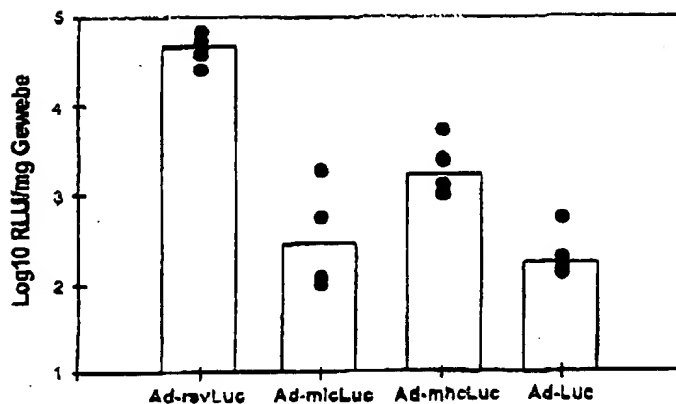
Dr. Wolfgang-M. Franz

01.10.96
+49-49-71002

S12

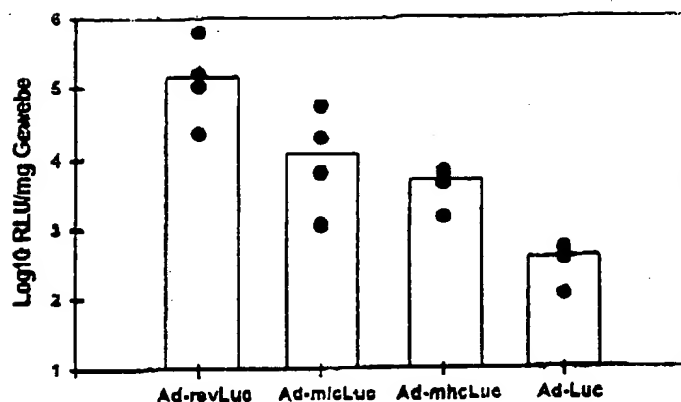
a)

Atrium



b)

Ventrikel



c)

Ventrikel/Atrium

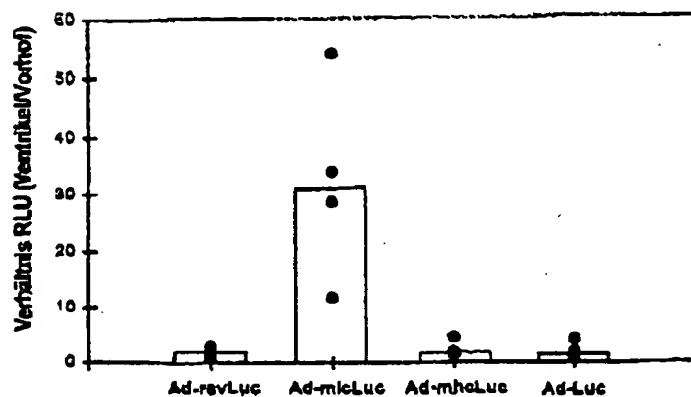


Abbildung 4: Luciferaseaktivität im Atrium (a) und Ventrikel (b) nach Injektion der rekombinanten Adenoviren Ad-rsvLuc, Ad-micLuc, Ad-mhcLuc und Ad-Luc. 2×10^9 p.f.u. in einem Volumen von 20-40 μ l wurden in den linken Ventrikel neonataler Ratten injiziert. Die Gewebe wurden fünf Tage nach der Injektion analysiert. Die Luciferaseaktivität wird gemessen in „Relative Light Unit“ (RLU)/mg Gewebe (Naßgewicht). Die Säulen zeigen den Median aus vier Experimenten an, die Punkte geben die Ergebnisse der Versuchstiere an. (c) Verhältnis der Luciferaseaktivität (RLU) im Ventrikel und Vorhof. Die Punkte geben die Verhältnisse der Aktivitäten im Ventrikel und Vorhof für ein Tier an. Der Balken gibt den Median an.

11 ~~#~~. Vektorsystem nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen
Genshuttle auf der Basis ein r Lipofektion

2.0

12 ~~#~~. Vektor-System nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet,
daß als therapeutisches Gen die cDNA eines Gens verwendet
wird, das bei der zu behandelnden Krankheit qualitativ oder
quantitativ verändert ist.

13 ~~#~~. Vektorsystem nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß
der ventrikuläre MLC-2-Promotor als Fusionskonstrukt mit
Luciferase eingesetzt wird.

14 ~~#~~. Vektorsystem nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß
das MLC2/Luciferase-Fusionskonstrukt durch Klonierung des
BamHI/KpnI MLC-Luciferase-Fragments(ca. 0,8 Kb "myosin light
chain"-2v-Promotor und 1,8 Kb Luciferasegen) aus Plasmid pMLCL
5' direkt in die BamHI/KpnI-Schnittstellen des Plasmids pAd-
RSVBgal-erhalten wird.

15 ~~#~~. Vektor-System nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet,
daß Teile oder Varianten des MLC-2-Promotors eingesetzt
werden.

16 ~~#~~. Verfahren zur Herstellung des Vektor-Systems nach Anspruch
1-10, dadurch gekennzeichnet, daß in einem adenoviralen
Vektor die El-Genregion oder eine andere Region durch ein
therapeutisches Gen mit dem MLC-2-Promotor ersetzt wird.